Analyse des interactions entre deux champignons antagonistes :

TRICHODERMA VIRIDE PERS. ET *BOTRYTIS CINEREA* PERS. EX FR.

Études préliminaires

par P. LAMY KRAFFT et M.F. ROQUEBERT*

RÉSUMÉ. — L'étude de l'antagonisme entre *Trichoderma viride* et *Botrytis cinerea* a permis de mettre en évidence deux phases successives : la première est fongistatique et due à une substance antibiotique diffusible, tandis que la deuxième, liée au contact entre les deux myceliums, est fongicide.

ABSTRACT. - The study of antagonism between *Trichoderma viride* and *Botrytis cinerea* showed two successive steps : the first one is fongistatic, resulting from an antibiotic diffusible product, the second is fongicid and contact dependent.

INTRODUCTION

Les champignons du genre *Trichoderma* sont bien connus pour leurs propriétés antagonistes vis-à-vis d'un certain nombre de champignons parasites des végétaux. Depuis que VUILLEMIN (1887), a représenté des hyphes de *Trichoderma viride* s'enroulant autour de celles d'un *Mucor*, les études portant sur ce sujet ont été nombreuses.

Les auteurs s'orientèrent dans l'une ou l'autre des directions suivantes :

* Laboratoire de Cryptogamie du M.N.H.N., 12 rue Buffon, 75005 Paris. - LA 257 (CNRS).

Source : MNHN, Paris

- Étude d'un antagonisme qu'ils soupçonnaient purement physique, par l'observation microscopique des hyphes des deux champignons en présence (BOOSALIS, 1956; CHI, 1960).

- Mise en évidence d'un antagonisme chimique par isolement et identification de substances antibiotiques secrétées par le *Trichoderma* (WEINDLING et EMERSON, 1936; BRIAN, 1944; BRIAN et MAC GOWAN, 1945; DENNIS et WEBSTER, 1971).

Dans le cadre des recherches du premier type, on a pu observer une pénétration des hyphes de *Trichoderma* à l'intérieur de celles du champignon attaqué (CHI, 1960; DURRELL, 1968).

Dans le cas des recherches chimiques, des antibiotiques responsables de l'antagonisme (du type gliotoxine et viridine) ont été isolés par WEINDLING et EMERSON en 1936. Cependant, il semble que l'identification de la souche productrice ait été douteuse. Après de nombreuses discussions à ce sujet, il appartint à WEBSTER et LOMAS (1964) de préciser l'identité systématique du champignon comme *Gliocladium virens* Miller, Giddens et Foster.

Toutefois les recherches effectuées sur des souches de vrais *Trichoderma* montrent leur faculté de secréter des substances antifongiques (DENNIS et WEBSTER, 1971).

Les relations entre les deux types d'action (physique et chimique) ont commencé à être étudiées par DENNIS et WEBSTER (loc. cit.). En même temps qu'ils mettaient en évidence de nouveaux antibiotiques volatiles et non volatiles (trichodermine, antibiotiques peptidiques, acétaldéhyde), les auteurs purent noter une vacuolisation et une coagulation cytoplasmique induites par les souches productrices d'antibiotiques. Par contre, l'envahissement et l'arrêt de croissance des hyphes des champignons attaqués étaient également causés par des souches non productrices d'antibiotiques; par là, DENNIS et WEBSTER mirent en évidence l'inégalité d'aptitude à la production d'antibiotiques, par les souches d'une même espèce.

Par l'étude dynamique du processus antagoniste entre *T. viride* et *B. cinerea* nous avons cherché, dans le présent travail à caractériser chaque étape de l'antagonisme par son déterminisme, son déroulement et son aboutissement.

MATÉRIEL

Les souches de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. et *Trichoderma viride* Pers. sur lesquelles a porté notre travail nous ont été fournies par la société ORSAN. Leur identification a été confirmée au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. La souche de *Botrytis cinerea* est résistante au bénomyl.

Source : MNHN, Paris

MÉTHODES

L'observation de l'antagonisme en microscopie optique a été réalisée selon la technique de COLE et SAMSON (1979). Nous en rappellerons ici brièvement le principe.

Dans une boîte de Pétri contenant du milieu gélosé en faible épaisseur, on découpe puis on prélève un carré de 1 cm de côté, prolongé latéralement par deux petits couloirs opposés. La face inférieure de la boîte est ainsi mise à nu, l'évidement effectué permettant le passage direct de la lumière. Une fois la chambre réalisée, les champignons sont ensemencés sur les faces opposées de l'ouverture, immédiatement recouverte d'une lamelle stérile. L'ensemble est ensuite déposé sur la platine du microscope et l'on peut ainsi suivre le développement des champignons vers l'intérieur. Des photos sont alors prises de la rencontre des deux champignons. L'aération indispensable à un développement normal est assuré par des canaux latéraux. Pour remédier à la déshydratation consécutive au léger échauffement dû à la lumière, on peut, par ces mêmes canaux, déposer régulièrement quelques gouttes d'eau stérile. Cette technique permet de distinguer très facilement les hyphes des deux protagonistes, car *B. cinerea* forme des appressoria sur le support dur constitué par la lamelle de verre.

La dégénérescence cytoplasmique, reflétée par la vacuolisation des hyphes (BULLER, 1933) a été mise en évidence grâce à l'adjonction de rouge neutre à une concentration de 0,06% (IKEDIUGWU and WEBSTER, 1970), dans le milieu de culture (Malt: 2%; Agar: 2%). Ce milieu coulé sur des lames est ensuite ensemencé par une suspension de spores, d'un seul des deux champignons pour les lames témoins, des deux champignons face à face, pour les confrontations. Les observations au microscope sont effectuées sous lamelle directement posée sur la culture, au niveau de la zone de rencontre des deux fronts mycéliens, au niveau du front mycélien pour les cultures pures.

Afin de mettre en évidence les seuls effets des métabolites de *T. viride* sur la croissance de *B. cinerea*, nous avons expérimentalement empêché tout contact

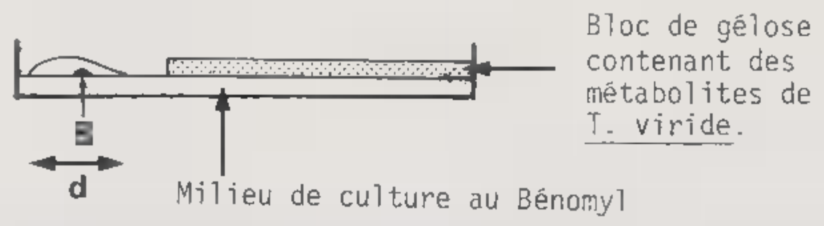


Schéma 1. — Coupe d'une boîte de Pétri dans laquelle sont confrontés *B. cinerea* et un bloc de gélose ayant auparavant supporté une culture de *T. viride*. B: ensemencement de *Botrytis*; d: diamètre de la colonie mycélienne.

Source : MNHN, Paris

entre les myceliums des deux champignons. Pour ce faire, nous avons joué sur le caractère résistant au bénomyl de notre souche de *B. cinerea*.

Dans une première expérience, une barrière chimique a été interposée entre les deux champignons, en coulant du milieu contenant du bénomyl (100 mg/l) suivant un diamètre de la boîte de Pétri. De part et d'autre de cette zone, se trouve du milieu sans bénomyl sur lequel on ensemence les deux champignons. Nous avons ainsi créé une frontière infranchissable par *T. viride*, mais ne gênant en aucun cas la croissance de *B. cinerea*.

Dans les essais suivants, nous n'avons plus mis en présence *B. cinerea* et *T. viride*, mais *B. cinerea* et un milieu sur lequel avait poussé *T. viride* et donc contenant quelques uns de ses métabolites. Dans ce but, nous avons fait des cultures de *T. viride* sur milieu solide recouvert de cellophane stérile. Une fois le milieu totalement envahi, nous enlevions la colonie mycélienne en prélevant la cellophane sous-jacente.

Nous avons ainsi réalisé deux types d'expérience :

- Dans la première, nous avons fait pousser *T. viride* dans des boites de Pétri de 6 cm de diamètre jusqu'à envahissement complet du milieu. Le contenu de la boîte débarrassé de la colonie mycélienne (gélose) était alors transporté dans une boîte de 9 cm de diamètre remplie de milieu au bénomyl (pour éviter le développement des hyphes de *T. viride* qui auraient pu passer sous la cellophane). En vis-à-vis, on ensemence *B. cinerea* (cf. schéma 1). Des mesures du diamètre de la colonie de *B. cinerea* sont ensuite effectuées au cours du temps. Nous avons ainsi réalisé cinq boîtes :

1 boîte avec une gélose en position normale (face supérieure initiale dirigée vers le haut),
1 boîte avec une gélose en position inverse (face supérieure initiale dirigée vers le bas),
1 boîte avec une demi-gélose en position normale,
1 boîte avec une demi-gélose en position inverse,
1 boîte témoin sans gélose.

- Dans la deuxième expérience, nous avons simplement, après prélèvement de la feuille de cellophane supportant *T. viride*, fait doucement refondre le milieu pour y ajouter le bénomyl, puis, après resolidification, ensemencé *B. cinerea*.

RÉSULTATS

Observations microscopiques

Les cultures en chambre montrent la tendance qu'ont généralement les hyphes de *T. viride* à longer celles de *B. cinerea* et à former de courtes ramifications vers les hyphes de ce dernier. Des photos (pl. 1) mettent en évidence

Source : MNHN, Paris

ce phénomène qui semble entraîner une vacuolisation d'autant plus intense que l'accolement est ancien.

Cette vacuolisation, associée à l'accolement des hyphes des deux antagonistes a été confirmée par l'adjonction de rouge neutre dans le milieu de culture: en effet, si les cultures pures, servant de témoins nous ont présenté des hyphes à peu près exemptes de vacuoles, par contre, les confrontations ont montré des hyphes de *B. cinerea* longées par celles de *T. viride*, soit remplies de petites vacuoles, soit complètement vidées de leur contenu cytoplasmique (pl. 2).

Effets des métabolites de *Trichoderma viride*

Dans le but de caractériser le type d'action inhibitrice de *T. viride* nous avons cherché à mettre en évidence l'existence de produits antibiotiques diffusibles ou non dans le milieu de culture et à préciser l'effet de leur concentration et leur rôle dans l'antagonisme.

a) Mise en évidence d'une substance diffusible

Nous avons suivi l'avancée du front mycélien de *B. cinerea* en direction de la colonie de *T. viride* stoppée dans sa croissance à quelques centimètres en arrière de la barrière de bénomyl. Une semaine après l'ensemencement, alors que les témoins montraient un envahissement complet des boites par *B. cinerea*, les confrontations présentaient entre les deux antagonistes, une zone non colonisée. Le front mycélien de *B. cinerea* épousant en négatif celui de *T. viride* (pl. 3). Il semble donc que le contact ne soit pas nécessaire pour qu'il y ait une inhibition de croissance de *B. cinerea*. Cette inhibition est sans doute due à une substance diffusible dans la gélose.

N° prélèvement	Temps après ensemencement	Distance au front de T. viride
N° 1	48 h	1,3 cm en avant du front
N° 2	53 h	0,6 cm en avant du front
N° 3	72 h	1,1 cm en arrière du front
N° 4	77 h	1, 5 cm en arrière du front

Tab. 1. – Situation des prélèvements de *B. cinerea* en fonction du temps et de la distance au front de *T. viride*.

Source : MNHN, Paris

On pouvait, à la suite de cette première observation, se demander si ce produit entraînait uniquement un arrêt de croissance de *B. cinerea* ou s'il était responsable de sa mort. C'est pourquoi, nous avons tracé une courbe de croissance de *B. cinerea*. Afin de tester le caractère réversible ou non de l'inhibition, nous avons prélevé *B. cinerea* au niveau du front de croissance à des temps variés et donc à différentes distances du front de *T. viride*, et effectué une série de repiquages sur milieu au bénomyl. Le tableau 1 récapitule les différents prélèvements, leur âge et leur distance au front de *T. viride*.

Nous avons, en même temps que chaque prélèvement fait un repiquage du front de *B. cinerea* ensemencé en culture pure au même moment que les confrontations. Les mesures de diamètre des colonies nous ont alors donné les résultats suivants rassemblés dans le tableau 2.

Temps croiss.	Témoin	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4
20 h	2	2,4	1,6	0	0
30 h	2,5	2,8	2,4	0	0
60 h	5	5	5	0	0
90 h	7,5	7,3	8,3	0	0
110 h	9	9	8,7	0	0
115 h	9	9	9	0	0

Tab. 2. — Croissance ultérieure des prélèvements (cf. tab. 1) portés sur milieu neuf. (diamètres mycéliens en centimètres).

On remarque que *B. cinerea* prélevé avant l'affrontement, et, qui, présente déjà un retard de croissance (cf. fig. 1), remis dans des conditions normales, ne présente aucune anomalie de développement et a un comportement semblable à celui du témoin (cf. tab. 2). Par contre, les prélèvements effectués après le contact, sont incapables de reprendre une croissance qui avait été complètement stoppée par *T. viride*. Il semble évident qu'un contact est nécessaire pour tuer *B. cinerea*. Mais il reste encore à savoir si c'est le contact en lui-même et donc une action mécanique entre les hyphes ou bien une action biochimique qui a le plus d'importance.

Source : MNHN, Paris

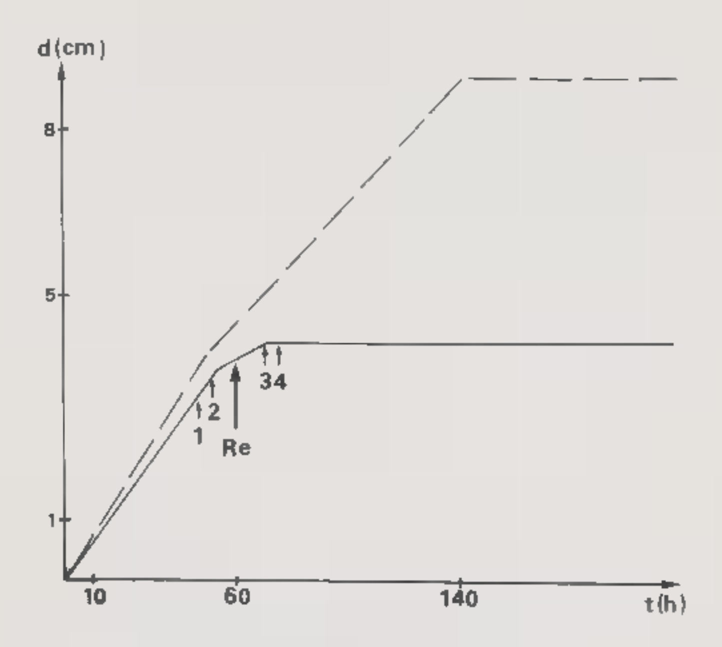


Fig. 1. — Courbes de croissance de *B. cinerea*. d: diamètre mycélien en centimètres; t: temps en heures; Courbe en trait plein: croissance de *B. cinerea* en présence de *T. viride*. Courbe en tirets: témoin. Re: rencontre des deux fronts mycéliens; Flèches 1, 2, 3, 4: prélèvements pour repiquages au niveau du front mycélien de *B. cinerea*.

On peut envisager qu'une concentration plus élevée en antibiotique à proximité de *T. viride*, ou un plus long temps d'absorption par *B. cinerea* de la substance fongistatique à faible dose aboutisse à la mort de *B. cinerea*. Une autre interprétation du phénomène serait de postuler l'existence d'une autre substance, fongicide, différente de celle décelée auparavant, peu diffusible dans la gélose, volatile ou facilement dégradée et dont l'effet serait facilité par un rapprochement entre l'émetteur et le récepteur.

b) Effet de la concentration en substance antibiotique

Afin de tester l'action de la concentration, nous avons réalisé les deux expériences suivantes, dont le principe général est de mettre en présence *B. cinerea* et un milieu contenant les métabolites de *T. viride*.

SENSIBILITÉ A DISTANCE

Nous avons consigné les résultats de l'expérience «blocs de gélose» dans le tableau 3, ainsi que dans les figures 2, 3, 4, 5 où sont représentés les différents diamètres de la colonie de *B. cinerea* au cours du temps et la courbe d'avancée du front mycélien en direction de la gélose inhibitrice.

Source : MNHN, Paris

Nous avons, parallèlement, effectué des prélèvements de *B. cinerea* à 115 h et 167 h. Repiqués sur milieu ordinaire, ils ont repris leur croissance, avec, toutefois, un léger retard par rapport au témoin.

Fig. 2, 3, 4 et 5. - Courbes de croissance de *B. cinerea* en présence d'un bloc de gélose ayant supporté une colonie de *T. viride*.

En abscisse, figure le temps (T) en heures. L'ordonnée représente le diamètre de la boîte de Pétri. Les points 0 et 9 matérialisant les bords de la boite. La surface ombrée représente, à chaque instant l'espace occupé par la gélose ayant supporté *T. viride*.

B: Position, au temps 0, de l'ensemencement de *B. cinerea*; d: diamètres positionnés dans la boîte, de la colonie de *B. cinerea* à différents moments.

Courbes en trait plein: croissance du front de *B. cinerea* le plus proche de la gélose; courbes en tirets: croissance témoin.

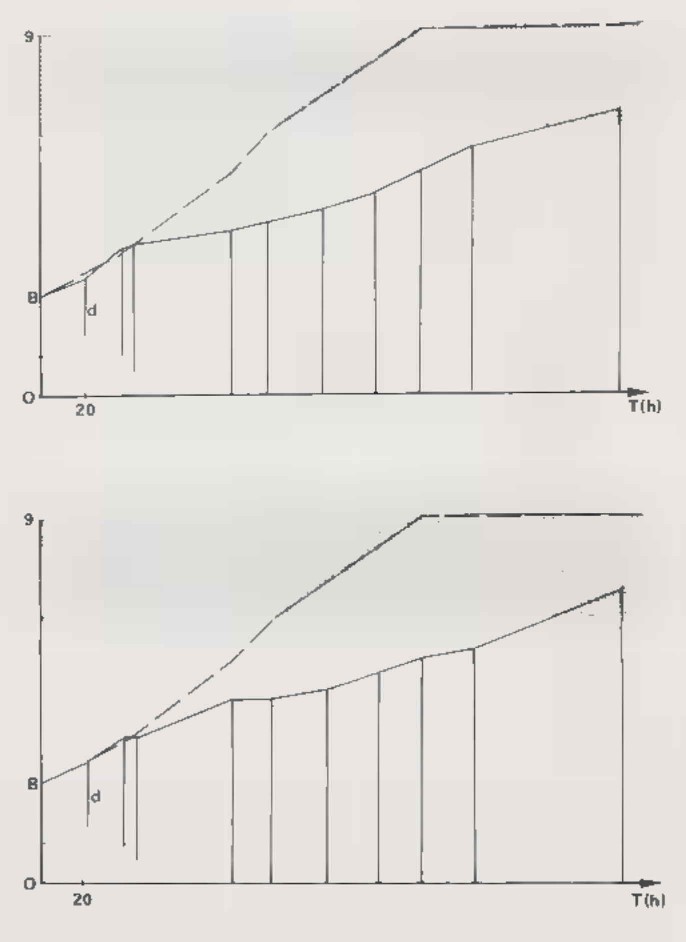


Fig. 2: demi-gélose en position normale; fig. 3: demi-gélose en position inverse.

Source : MNHN, Paris

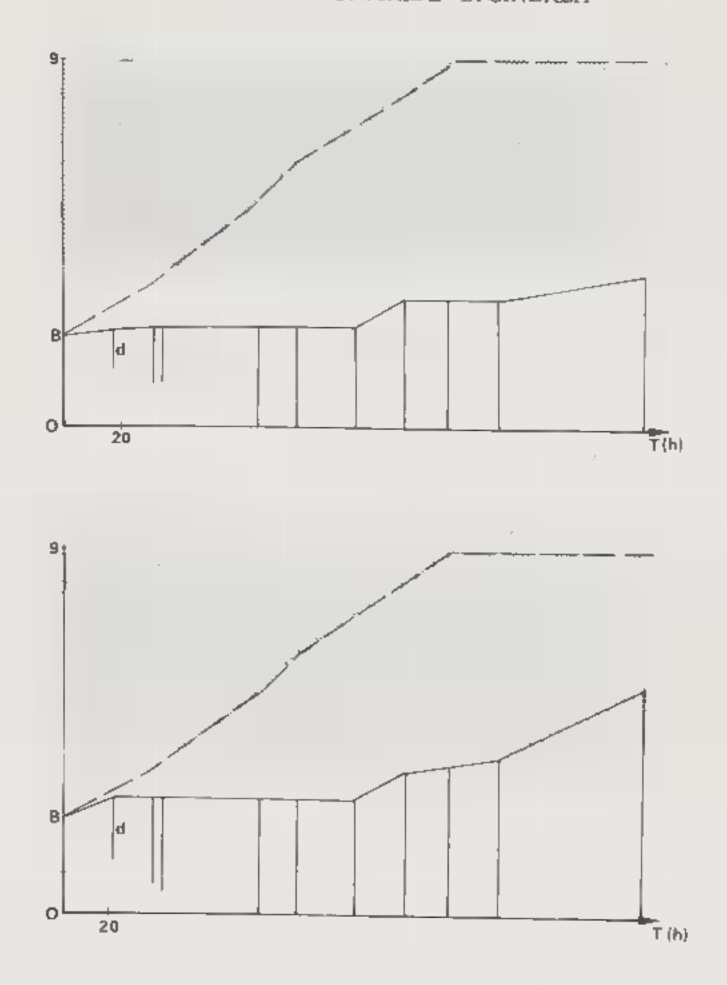


Fig. 4: gélose entière en position normale; fig. 5 : gélose entière en position inverse.

Cette expérience nous porte à confirmer la présence, parmi les métabolites de *T. viride*, d'un produit fongistatique diffusible dans la gélose (puisque la croissance est freinée avant que *B. cinerea* n'atteigne le bloc de gélose).

Il semble que les blocs entiers affectent plus tôt la croissance que les demi-blocs (ralentissement dès le début alors qu'il n'a lieu qu'au bout de 40 h pour les demi-blocs). Ceci pourrait s'expliquer soit par une plus grande quantité de produit disponible, soit par une distance de diffusion moins importante dans le cas des blocs entiers.

Source : MNHN, Paris

Temps de Culture	Témoin	Gél. Nor.	Gél. Inv.	1/2 Nor.	1/2 Inv.
24h	1,5	0,9	1,5	0,4	1,5
43h	3,0	1,4	1,9	2,6	2,6
48h	3,2	1,4	2,3	3,1	3,0
96h	5,5	2,5	2,8	4,0	4,5
115h	6,5	2,5	2,8	4,2	4,5
143h	7,4	2,5	2,8	4,5	4,7
167h	8,2	3,2	3,5	4,9	5,1
191h	9,2	3,2	3,7	5,4	5,5
215h	9,2	3,2	3,9	6,0	5,7
287h	9,2	3,8	5,7	6,9	7,3

Tab. 3. – Diamètres (en centimètres) des colonies de *B. cinerea*: en fonction du temps. Comparaison des croissances mycéliennes en culture pure : témoin; et en présence de blocs de gélose contenant les métabolites de *T. viride*. Gél. Nor.: gélose entière en position normale; Gél. Inv.: gélose entière en position inverse; 1/2 Nor.: demi-gélose en position normale; 1/2 Inv.: demi-gélose en position inverse.

SENSIBILITÉ IMMÉDIATE

Nous avons réalisé une deuxième série d'expériences où la concentration en métabolites était maximale pour une colonie de *B. cinerea* très réduite; nous avons déposé à la surface du milieu ayant supporté *T. viride*, un fragment mycélien de *B. cinerea*. Dans ces conditions, les vitesses de croissance observées ne montrent pas de différences significatives avec le témoin. Il est à noter, toutefois, que l'aspect cultural est très différent: dans le cas du témoin, on observe, après quelques jours, une colonie mycélienne très dense, au développement aérien très important, donnant à la colonie un aspect cotonneux et duveteux. Les cultures réalisées sur les métabolites de *T. viride* ne développent pas de mycélium aérien et les colonies ne forment qu'un léger voile à la surface immédiate de la gélose. Une observation microscopique révèle des altérations cytoplasmiques: décollement de la paroi, début de vacuolisation. Il n'y a donc, là encore, malgré la très grande quantité de substance supposée présente dans le milieu, que des altérations qui ne conduisent pas à la mort de *B. cinerea*, mais simplement à une altération de la croissance. (On peut noter ici que nous avons sous-entendu pour cette expérience que le (ou les) métabolite était non dégradé à la température de surfusion de la gélose, ce qui a été en partie vérifié).

Source : MNHN, Paris

DISCUSSION

L'ensemble des recherches effectuées sur l'antagonisme fongique des *Trichoderma* a porté principalement sur la recherche d'activité spécifique ou intraspécifique, ou sur la nature chimique des produits actifs.

Nous ne possédons que peu de données concernant le déroulement de ce mécanisme.

Nous avons mis en évidence deux étapes principales dans le déroulement de l'action antagoniste : à une première phase d'activité purement fongistatique, succède une phase finale, que l'on peut qualifier de fongicide.

La fongistase est due à une sécrétion, par *T. viride*, d'une substance dont l'action s'effectue à distance. En effet, en supprimant expérimentalement tout contact mycélien, nous avons mis en évidence son caractère diffusible dans le milieu de culture.

Cependant, cette première attaque n'est pas létale pour *B. cinerea* comme le montrent les repiquages effectués à ce stade.

Par contre, un temps de contact prolongé entre les mycéliums antagonistes entraîne la mort de *B. cinerea*. L'arrêt de croissance s'accompagne d'altération cytoplasmiques sensibles, principalement une vacuolisation précoce, gagnant peu à peu toutes les cellules. On peut supposer plusieurs causes à cet effet irréversible.

- Le maintien de *B. cinerea* dans un état de non- compétitivité vis-à-vis d'un adversaire qui, dans ces conditions finit par prendre le dessus.
- L'élaboration, par *T. viride*, de formations mycéliennes à fonction préhensile, comme celles qu'ont observé CHI (1960), DENNIS et WEBSTER (1971), etc... Nous n'avons pas pu mettre en évidence un dispositif de ce type, hormis les petits diverticules latéraux observés après un certain temps de contact.
- Enfin, l'émission d'un deuxième type de substance, fongicide, peu diffusible et (ou) rapidement dégradée, ou dont la sécrétion ne serait induite que par le contact d'un mycélium étranger.

Ces trois causes hypothétiques, non exhaustives, ne s'excluent pas mutuellement et, pourraient, éventuellement intervenir de façon conjointe.

Après cette étude principalement axée sur la première phase fongistatique de *T. viride*, seule une expérimentation ultérieure, portant sur la deuxième phase pourra expliquer le mécanisme de l'action létale de *T. viride* sur *B. cinerea*.

BIBLIOGRAPHIE

BOOSALIS M.G., 1956 – Effect of soil temperature and green manure amendment of unsterilized soil on parasitism of *Rhizoctonia solani* by *Penicillium vermiculatum* and *Trichoderma* species. *Phytopathology* 46 : 473-478.

Source : MNHN, Paris

BRIAN P.W., 1944 – Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Nature*, London, 154: 667-668.

BRIAN P.W. and MAC GOWAN J.C., 1945 – Viridin : a high fungistatic substance produced by *Trichoderma viride*. *Nature*, London, 156: 144-145.

BULLER A.H.R., 1933 – The translocation of protoplasms through the septate mycelium of certain Pyrenomycetes, Discomycetes and Hyphomycetes. In: BULLER, A.H.R., Researches on Fungi., vol. V, Part I, ch. II. Longmans, Green and Co, London, New York, Toronto.

CHI C.C., 1960 – Effects of *Streptomyces* and *Trichoderma* on *Fusarium*. *Phytopathology* 50: 631.

COLE G.T. and SAMSON R.A., 1979 – Patterns of development in conidial Fungi. London, San Francisco, Pitman.

DENNIS C. and WEBSTER J., 1971 – Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 1: 25-39.

DENNIS C. and WEBSTER J., 1971 – Id. II. Production of volatile antibiotics. Ibid. 57: 41-48.

DENNIS C. and WEBSTER J., 1971 — Id. III. Hyphal interaction. Ibid., 57, 3: 363-369.

DURRELL L.W., 1968 – Hyphal invasion by *Trichoderma viride*. *Mycopath. et Mycol. appl.* 35, 2: 138-144.

IKEDIUGWU F.E.O. and WEBSTER J., 1970 – Antagonism between *Coprinus heptemerus* and other coprophilous fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 54, 2: 181-204.

TRONSMO A. and RAA J., 1977 – Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Z.* 89: 216-220.

VUILLEMIN P., 1887 – Études biologiques sur les champignons. *Bull. Soc. Sci.* Nancy, Ser. II, 8, 20: 113-122.

WEBSTER J. and LOMAS N., 1964 – Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin? *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47, 4: 535-540.

WEINDLING R., 1932 – *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22, 10: 837-845.

WEINDLING R. and EMERSON O.H., 1936 – The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of a *Trichoderma*. *Phytopathology* 26: 1069-1070.

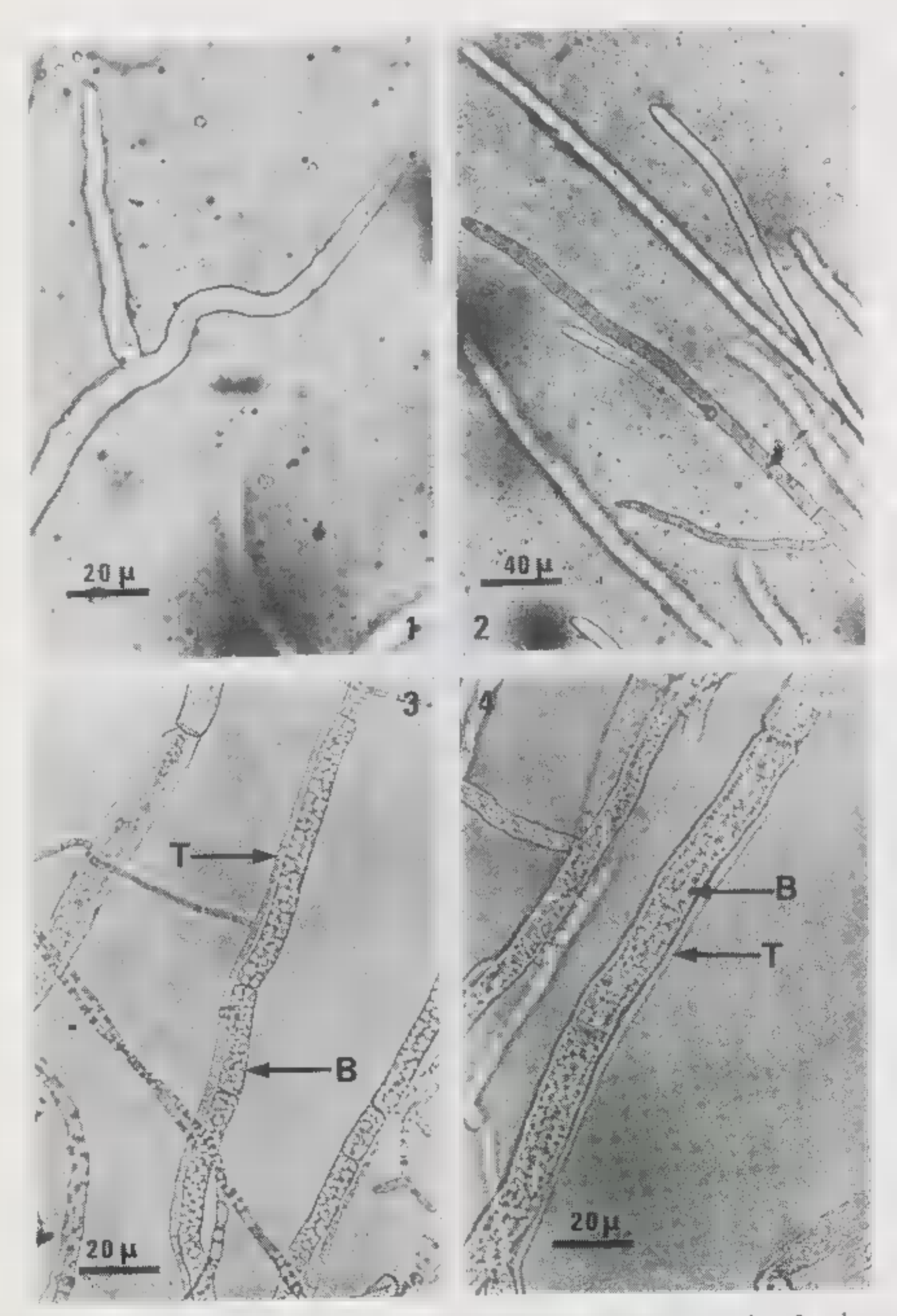
WEINDLING R., 1941 – Experimental consideration of the mold toxins of *Gliocladium* and *Trichoderma*. *Phytopathology* 31: 991-1003.

Source : MNHN, Paris



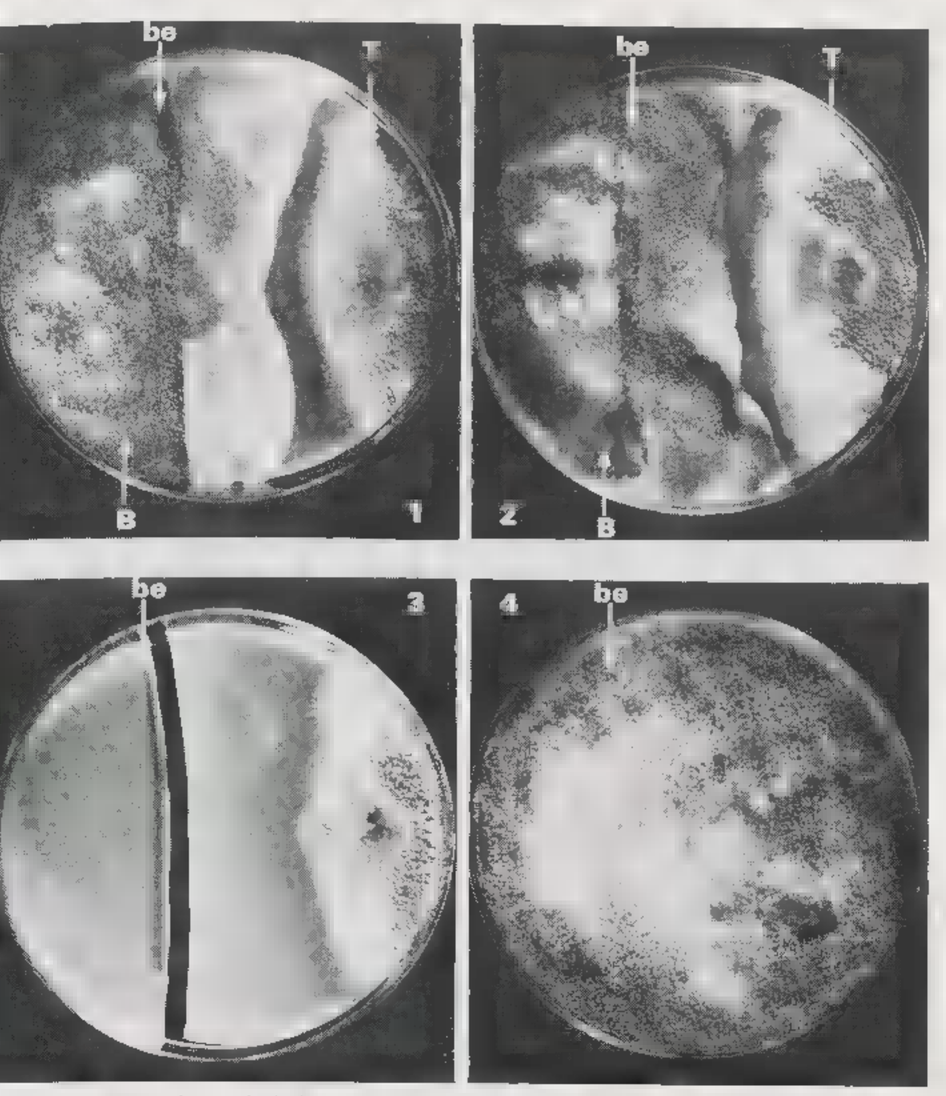
Pl. 1. — Microphoto d'un affrontement, en chambre gélosée, entre les hyphes de *Trichoderma viride* (T) et celles de *Botrytis cinerea* (B). Les flèches extérieures indiquent les directions d'avancée des deux champignons. Remarquer que la vacuolisation et la dégradation cytoplasmique des hyphes de *B. cinerea* sont d'autant plus marquées que l'accolement avec *T. viride* est ancien. - di: diverticules de *T. viride*; ap: appressorium de *B. cinerea*.

Source : MNHN, Paris



Pl. 2. – Microphotos des hyphes de *B. cinerea* colorées au rouge neutre. 1 et 2: cultures pures de *B. cinerea*. 3 et 4: confrontations entre *B. cinerea* (B) et *T. viride* (T). L'accolement des hyphes des deux champignons est accompagné d'une forte vacuolisation de celles de *B. cinerea*.

Source : MNHN, Paris



Pl. 3. — Macrophotos de boîtes de culture de *T. viride* et *B. cinerea*. Une barrière chimique au bénomyl (be) est présente dans chacune des boîtes. 1 et 2: confrontations *B. cinerea* / *T. viride* : *B. cinerea* est stoppé dans sa croissance à une légère distance de *T. viride*; 3: *T. viride* témoin; 4: *B. cinerea* témoin.

Les ensemencements ont été effectués 16 jours avant la prise de vue pour *T. viride*, 20 jours avant pour *B. cinerea*.

Source : MNHN, Paris